蓖麻 *RcMsc*2 基因功能分析

耿柳婷[1]，李艳肖[1]，张春兰[2]，于忠勇[3]，王桂玲[4]，向殿军[1]，刘 鹏[1*]

（1. 内蒙古民族大学 农学院，内蒙古 通辽 028000；2. 内蒙古民族大学 生命科学学院，内蒙古 通辽 028000；3. 内蒙古宏博种业科技有限公司，内蒙古 通辽 028000；4. 扎兰屯市绿色产业发展中心，内蒙古 扎兰屯 162650）

摘 要：G2/有丝分裂特异性细胞周期蛋白 2（G2/mitotic-specific cyclin-2，Msc2）作为高等植物应对逆境胁迫的关键调控蛋白，参与多个抗逆境胁迫的应答。为探究 *RcMsc*2 基因的功能，该研究从蓖麻叶片组织中成功克隆了 *RcMsc*2，并利用生物信息学分析 RcMsc2 蛋白的结构和潜在功能，同时借助 qRT-PCR 方法分析 *RcMsc*2 基因的组织表达特性和非生物胁迫表达特性。结果表明：（1）*RcMsc*2 基因位于蓖麻第 5 号染色体长臂，该基因的 CDS（coding sequence）区是 1 299 bp，编码 432 个氨基酸。（2）RcMsc2 蛋白拥有细胞周期（cyclin）家族特征结构域，是一个不稳定酸性亲水蛋白，无跨膜域和信号肽，相对分子量是 49.38 kD。（3）RcMsc2 蛋白的二级、三级结构以α-螺旋和无规则卷曲为主。（4）RcMsc2 蛋白与麻风树和巴西橡胶树的 CYCB2 蛋白的序列同源性最高，且同被聚为 Group II。（5）*RcMsc*2-GFP 融合蛋白定位于细胞核。（6）*RcMsc*2 基因在蓖麻的所有组织中均有表达，且主要在根和茎中发挥作用；非生物胁迫分析表明 *RcMsc*2 基因可以被脱落酸（abscisic acid, ABA）、盐、干旱和低温处理诱导表达，并且 *RcMsc*2 基因对低温胁迫的响应最敏感。综上，该研究较全面地分析了 *RcMsc*2 基因的结构特征、系统进化和表达模式，为揭示 *RcMsc*2 基因在蓖麻的生长发育和应答冷胁迫过程中的功能提供理论参考。

关键词：蓖麻，*RcMsc*2，基因克隆，表达特性，冷胁迫

中图分类号：Q943　　　　　　**文献标识码：**A

Functional analysis of *RcMsc*2 gene in castor（*Ricinus comunis*）

GENG Liuting[1], LI Yanxiao[1], ZHANG Chunlan[2], YU Zhongyong[3], WANG Guiling[4], XIANG Dianjun[1], LIU Peng[1*]

（1. *College of Agriculture Life Science, Inner Mongolia Minzu University*, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China; 2. *College of Life Science, Inner Mongolia Minzu University*, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China; 3. *Inner Mongolia Hongbo Seed Industry Technology limited company*, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China, 4. *Zhalantun Green Industry Development Center*, Zhalantun 162650, Inner Mongolia, China）

Abstract: G2/mitotic-specific cyclin-2 (Msc2), as a key regulatory protein in response to stress in higher plants, is involved in multiple responses to stress. In order to explore the function of *RcMsc*2 gene which was successfully cloned from castor leaf tissue. The structure and potential function of RcMsc2 protein were analyzed by bioinformatics, and the expression characteristics of

基金项目：国家自然科学基金（31860389，32060492）；内蒙古自治区自然科学基金（2022MS03057，2020LH03006）[Supported by National Natural Science Foundation of China (31860389, 32060492); Inner Mongolia Autonomous Region Natural Science Foundation Project (2022MS03057, 2020LH03006)]。

第一作者：耿柳婷（1997-），硕士研究生，研究方向为作物遗传改良与种质创新，(E-mail) 2214883304@qq.com。

[*]**通信作者：**刘鹏，博士，教授，研究方向为作物遗传育种，(E-mail) mindaliupeng@126.com。

*RcMsc*2 gene in tissue and abiotic stress were analyzed by qRT-PCR. The results were as follows: (1) *RcMsc*2 gene was located in the long arm of castor chr 5, and its CDS region was 1 299 bp, encoding 432 amino acids. (2) RcMsc2 protein has the characteristic domain of cyclin family, which is an unstable acidic hydrophilic protein without transmembrane domain and signal peptide, and its relative molecular weight is 49.38 kD. (3) The secondary and tertiary structures of RcMsc2 protein were mainly α-helix and random coil. (4) RcMsc2 protein had the highest sequence homology with CYCB2 protein of *Jatropha curcas* and *Hevea brasiliensis*, and was clustered into Group II. (5) *RcMsc*2-GFP fusion protein was localized to the nucleus. (6) *RcMsc*2 gene was expressed in all tissues of castor, and mainly played a role in roots and stems; Abiotic stress analysis showed that *RcMsc*2 gene could be induced by abscisic acid (ABA), salt, drought and low temperature treatment, and the response of *RcMsc*2 gene to low temperature stress was the most sensitive. In summary, this study comprehensively analyze the structural characteristics, phylogenetic evolution and expression patterns of *RcMsc*2 gene, and provide a theoretical reference for revealing the function of *RcMsc*2 gene in castor growth and development and response to cold stress.

Key words: castor, *RcMsc*2, gene cloning, expression characteristics, cold stress

蓖麻（*Ricinus communis*）是一种产于非洲的大戟科多年生草本植物，可以在热带和温带地区种植（Maghuly et al., 2015）。因蓖麻油中含有丰富的蓖麻油酸，现已被列为第二代生物质绿色能源的重要原料（Trabelsi et al., 2018）。蓖麻拥有极强的抗旱和耐盐碱能力，可以在较贫瘠的土地上生长，但在苗期易受细菌感染和冷胁迫的危害，最终导致植株成活率降低和籽粒品质下降（Severino et al., 2012; Wang et al., 2022）。内蒙古通辽位于中纬度地区，在作物的生长期这里平均最低气温最高 16.1 ℃，最低仅 12.7 ℃，这种低温环境严重影响着蓖麻种子的萌发、生长和生物量的积累（Tao et al., 2020）。因此，如何改善低温环境对蓖麻生长发育的影响并选育出多抗非生物逆境胁迫的新品种，对未来的蓖麻种植产业及满足工业对于蓖麻油的需求具有重要意义。

细胞分裂是生物生长发育中最基本的过程（Van et al., 2010）。真核细胞的细胞周期进程主要是由细胞周期蛋白依赖性激酶（CDK）的蛋白激酶家族控制（Suryadinata et al., 2010）。根据生物体的类别不同，细胞周期蛋白也根据它们在细胞周期中发挥作用的阶段分为细胞周期蛋白 M 和细胞周期蛋白 G1（Canaud et al., 2019）。G1 周期蛋白包括 C、D、E 和 G 共 4 种类型以调节 G1-S 转换，M 周期蛋白包括 A 和 B 共 2 种类型，可以在 S-M 转变、G2-M 过渡阶段和 M 阶段内起作用（Kõivomägi et al., 2011）。G2/有丝分裂特异性细胞周期蛋白-2（G2/mitotic-specific cyclin-2，Msc2）属于 B 型细胞周期蛋白，并通过在 G2 期到 M 期的转变、G2 期内和 M 期内的短暂时间内表达以响应环境变化（Hégarat et al., 2020）。最近的研究发现，*CYCB2* 基因可能参与植物的盐胁迫、重金属胁迫、脱落酸（abscisic acid, ABA）和冷胁迫下的表达（Xu et al., 2010; Huang et al., 2013; Fan et al., 2022），烟草（*Nicotiana tabacum*）*NtCycB*2 基因随着 NaCl 处理时间的延长表达量减少，而敲除 *NtCycB*2 基因可以提高植株在 NaCl 胁迫下的抵抗力（Yan et al., 2021）；高粱（*Sorghum bicolor*）的转录组研究发现 *CYCB*2 基因在 100 μmol·L^{-1} 和 150 μmol·L^{-1} 镉（Cd）金属离子胁迫下表达量均上升，说明高粱的 *CYCB*2 基因可能参与抗重金属胁迫调控机制（Roy et al., 2016）；拟南芥 atl17 突变株与 WT 型植株相比，在 ABA 不同浓度梯度处理下，*CYCB*2;1 在 atl17 的表达量显著高于 WT，表明可能通过 ABA 调控机制抑制主根的生长而抵御逆境（Xu et al., 2010）；甘蓝（*Brassica oleracea*）的冷胁迫试验表明，*CYCB*2 基因在 2 d 和 7 d 的表达模式差异显著，*CYCB*2;1、*CYCB*2;2、*CYCB*2;3 和 *CYCB*2;4 的 Log_2 值均高于对照，但处理 7 d 的 *CYCB*2 表达量显著低于 2 d，表

明 *CYCB*2 基因可以在冷胁迫的短期内提高植株的细胞分化能力来减轻冷胁迫带来的伤害（Ćosić et al., 2019）。但是 *CYCB*2 基因在蓖麻中的潜在功能及调控机制研究较少，而蓖麻作为重要的生物原料，研究其抗逆机制就显得尤为重要。

蓖麻转录组数据中表达上调的 DEGs 有 848 个，而 *RcMsc*2（XP_002521704.1）在低温（相较于适温 25 ℃）下的表达显著上调，并且作为拟南芥 *CYCB*2;3 的同源基因，很可能在蓖麻的冷适应过程中发挥作用（白雪等，2019）。因此，我们克隆了 *RcMsc*2 基因，借助烟草叶片细胞明确 *RcMsc*2 基因的亚细胞位置，并通过 qRT-PCR 技术分析其在不同胁迫下的表达模式。本研究旨在探讨：（1）RcMsc2 蛋白理化性质、结构及物种间的进化关系；（2）蓖麻 *RcMsc*2 基因的组织表达模式及非生物胁迫下的表达模式；（3）蓖麻 *RcMsc*2 在冷胁迫过程中的潜在功能。本研究为蓖麻的抗低温育种提供了潜在的基因资源，同时为解析蓖麻 *RcMsc*2 基因在应对冷胁迫方面的调控机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1 试验材料

‘通蓖 5 号’由通辽市农牧科学研究所提供。植物总 RNA 提取试剂盒（Monzol™ Reagent）、反转录试剂盒（MonScript™ RTIII All-in-One Mix with dsDNas）购于莫纳生物公司。T-载体（pMD™ 18-T vector）、限制性内切酶（*Bsa* I）和 DNA 连接试剂盒（DNA Ligation Kit）购于宝日医生物公司。高保真 PCR 酶（KOD Master Mix）、PCR 产物回收和纯化试剂盒购自天根生化科技有限公司。Maxima Reverse Transcriptase 和 2X SG Fast qPCR Master Mix 购自赛默飞世尔科技（上海）公司。大肠杆菌感受态（DH5α）、保真酶（2×*Taq* Master Mix）、引物合成和测序由生工生物有限公司完成。

1.2 材料处理

将健康的蓖麻种子消毒后置入适量的无菌水中，于 30 ℃催芽 3 d。出芽后将其平均分成 4 份，并整齐的摆放在水培盘中，待 2 片子叶展开后开始浇灌 1/4 Hoagland 溶液，每日补充 200 mL。当幼苗长至 4 叶龄时，剪取幼苗的组织（根、茎、子叶和真叶）以检测 *RcMsc*2 基因的组织表达量；然后分别对其进行 4 ℃、150 mmol·L^{-1} NaCl、10% PEG 6000 和 100 μmol·L^{-1} ABA 胁迫，经时间梯度（0、2、4、8、12、24、30、48 h）处理后采集幼苗的真叶并迅速存于液氮中，冷冻 24 h 后转移至 –70 ℃冰箱备用。

1.3 *RcMsc*2 基因的克隆

1.3.1 总 RNA 提取和第一链 cDNA 的合成

参照 Monzol™ Reagent 试剂盒的说明书操作步骤，提取 4 ℃处理 12 h 的蓖麻组织的总 RNA，并检测纯度。以提取的 RNA 作为模板，参照 MonScript™ RTIII All-in-One Mix with dsDNas 试剂盒说明书反转录合成第一链 cDNA，作为克隆 *RcMsc*2 基因的模板。

1.3.2 *RcMsc*2 基因的克隆及测序

根据 NCBI 数据库公布的 *RcMsc*2 基因(XP_002521704.1)的 CDS 区设计引物 RcMsc2-F | RcMsc2-R（表 1）。以蓖麻 cDNA 为模板，使用高保真酶（KOD Master Mix）扩增 *RcMsc*2 基因的 CDS 序列，PCR 扩增反应程序：94 ℃预变性 4 min; 94 ℃变性 30 s, 58 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 90 s, 35 个循环; 最后终延伸 10 min。经电泳检测后将符合大小的片段回收，在 3′端加 A 碱基后利用 DNA 纯化试剂盒纯化产物后连接至 T 载体，将 pMD™ 18-T-*RcMsc*2 热击转化 DH5α，在 Kan^{+}培养基上筛选出阳性克隆送至生工测序。

1.4 RcMsc2 蛋白质的生物信息学分析

借助 ExPASy（https://web.expasy.org/translate/）工具将 *RcMsc*2 基因的编码序列翻译成蛋白序列。在 NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov）下载蓖麻的全基因组、蛋白组和注释文件，将 RcMsc2 蛋白作为靶序列进行本地 blastp，以明确 *RcMsc*2 基因的具体位置。使用蛋

白分析网站 ExPASy-PROSITE（https://prosite.expasy.org）分析 RcMsc2 蛋白质的理化性质和亲水/疏水性。借助 NCBI-CD-SEARCH（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi）、PSORT（http://psort.hgc.jp/）和 Motif Scan（https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif_scan/）工具分别预测蛋白的结构域、亚细胞位置和生物活性位点。使用在线工具 SignalP 5.0（https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0）、DeepTMHMM（https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM）和 Motif Scan（https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif_scan）分别预测该蛋白的信号肽、跨膜域和生物活性位点。利用 UniprotKB 数据库（https://www.uniprot.org/help/uniprotkb）在线 blastp 程序下载 RcMsc2 蛋白质的同源序列，使用 ClustalW 和 MEGA 11.0 软件对下载的序列进行比对及可视化分析，并将多序列比对结果提交至 ENDscript/ESPript（https://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi）网站进行美化，进化树提交至 iTOL（https://itol.embl.de）网站进行美化。蛋白的二级结构在 SOPMA（https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl）进行可视化预测。将 RcMsc2 蛋白提交至 SWISS-MODLE（https://swissmodel.expasy.org/）预测三级结构，并借助 SAVES v6.0（https://saves.mbi.ucla.edu/）工具对预测模型打分，检测合格后对蛋白的三级结构进行分析。

1.5 *RcMsc2* 基因的表达分析

根据 *RcMsc*2 基因的 CDS 序列设计 qRT-PCR 引物 RcMsc2-Fx | RcMsc2-Rx（表 1），以 *RcActin*（NC_063262.1）基因作为内参基因，分析 *RcMsc*2 基因的组织表达模式及胁迫处理下的表达模式。以 Trizol 法提取蓖麻组织的总 RNA，并反转录成单链 cDNA 作为 PCR 扩增的模板，严格按照 2X SG Fast qPCR Master Mix 的说明书操作步骤，在 LightCycler480 II 型 PCR 仪上完成对基因的扩增。反应程序：预变性 95 ℃ 3min，变性 95 ℃ 5 s，退火和延伸 60 ℃30 s，45 个循环。用 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$法计算 *RcMsc*2 基因的相对表达量。

1.6 RcMsc2 蛋白质亚细胞定位

使用限制性酶 *Bsa* I 对 pCAMBIA2300-CaMV 35S-GFP 进行酶切，回收目的片段。将 pMD™ 18-T-*RcMsc*2 作为重组 DNA 的模板，扩增引物为 Rc*Msc*2-GFP-Fx | Rc*Msc*2-GFP-Rx。使用 KOD Master Mix 将模板序列连接在 pKY-35S-GFP 载体上，并将产物转化至 DH5α感受态细胞，筛选出阳性克隆并送至生工测序。测序结果正确后将 pKY-35S-*RcMsc*2-GFP 载体转至农杆菌中，最终在烟草叶片的表皮细胞中瞬时表达以确定 *RcMsc*2 基因的亚细胞位置。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′–3′） Primer sequence（5′–3′）	用途 Application
RcMsc2-F	TTGACTGGCTTATTGAGGTG	基因克隆
RcMsc2-R	CAACCAACCCCACCAACTGA	Gene cloning
RcMsc2-Fx	CGAGCACTAATGGGTTTGGA	qRT-PCR
RcMsc2-Rx	CCATCAATATCCACAATAGGCTC	
Actin-F	TTCCCAGGCATTGCTGATAG	
Actin-R	ACATCTGCTGGAAGGTGCTG	
Rc*Msc*2-GFP-Fx	CAGTGGTCTCACAACATGAATGTATCTGATGAGAA	亚细胞定位
Rc*Msc*2-GFP-Rx	CAGTGGTCTCATACATGACTGAGTCTCTAATAGAA	Subcellular localization

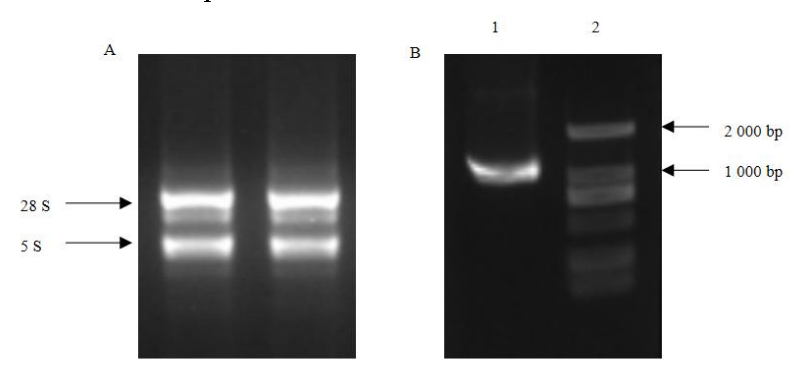
注：下划线是 *Bsa* I 酶切位点，左侧是保护碱基，右侧是荧光表达载体的末端同源序列。

Note: The bottom line is the *Bsa* I cleavage site, the left is the protective base, and the right is the end homologous sequence of the fluorescent expression vector.

2 结果与分析

2.1 *RcMsc*2 基因的克隆

根据前期转录组数据信息，提取蓖麻叶片总 RNA，质量符合反转录操作要求（图 1：A）。并以 cDNA 为模板进行目的基因的扩增，得到大约 1 300 bp 的条带（图 1：B），并经过 T-A 克隆、转化、阳性菌落的克隆和测序，得到 1 299 bp 的 ORF，推导其编码 432 个 aa（图 2），并命名为 *RcMsc*2，本地 blastp 检索发现其定位在第 5 号染色体长臂。



A. 蓖麻总 RNA 的提取; **B**. *RcMsc*2 基因 CDS 区扩增。**1**. PCR 产物; **2**. DL 2 000 DNA Marker。

A. Extraction of total RNA from *Ricinus comunis*; **B**. Amplification of the CDS region from *RcMsc*2 gene. **1**. PCR production; **2**. DL 2 000 DNA Marker.

图 1 总 RNA 的提取和 *RcMsc*2 基因的扩增

Fig. 1 Total RNA extraction and the *RcMsc*2 gene amplification

```
atg aat gta tct gat gag aac aat cct aac att gca aaa ccc tca agt ttt caa gga gga
 M   N   V   S   D   E   N   N   P   N   I   A   K   P   S   S   F   Q   G   G
tta gag atg ggt aac aga aag ttt ggg caa gag att agg aac aac aga aga gct cta aat
 L   E   M   G   N   R   K   F   G   Q   E   I   R   N   N   R   R   A   L   N
gtg tta aat cag aat ttt atg gga gga caa gga gca tat cct tgt gtt gtt aac aag aga
 V   L   N   Q   N   F   M   G   G   Q   G   A   Y   P   C   V   V   N   K   R
gga tta tca gaa agt gat gga gtc tgt gaa aga aac caa ctt aat cct gca cat cgg cca
 G   L   S   E   S   D   G   V   C   E   R   N   Q   L   N   P   A   H   R   P
att aca agg aag ttt gct gca caa ttg tca agt aca cat cag aat tgt ccc cag gag act
 I   T   R   K   F   A   A   Q   L   S   S   T   H   Q   N   C   P   Q   E   T
aaa aag cat aag cct tca gtt tcg agc act aat ggg ttt gga gac tct ata ttc ata gat
 K   K   H   K   P   S   V   S   S   T   N   G   F   G   D   S   I   F   I   D
gtg gaa gaa aat aag gcc gct gaa gac cat cca gaa cca atg ttt tta gaa caa aca gaa
 V   E   E   N   K   A   A   E   D   H   P   E   P   M   F   L   E   Q   T   E
gca acc ctt gat gaa atg gag gag gtt gaa atg gag gat ata att gaa gag cct att gtg
 A   T   L   D   E   M   E   E   V   E   M   E   D   I   I   E   E   P   I   V
gat att gat ggc tgt gat gca aag aat ccc ctt gca gtt gtt gat tat gtt gaa gat ttg
 D   I   D   G   C   D   A   K   N   P   L   A   V   V   D   Y   V   E   D   L
tat gcc aac tat aga aaa ata gag aac ttt acc tgt gtc tcc caa aac tat atg gca caa
 Y   A   N   Y   R   K   I   E   N   F   T   C   V   S   Q   N   Y   M   A   Q
cag ttt gac att aat gag aag atg aga gcc ata ctg att gac tgg ctt att gag gtg cat
 Q   F   D   I   N   E   K   M   R   A   I   L   I   D   W   L   I   E   V   H
gac aag ttt gat ctt atg aaa gag aca tta ttt ctt acg gtt aat ctc atc gat aga ttt
 D   K   F   D   L   M   K   E   T   L   F   L   T   V   N   L   I   D   R   F
cta tca cag caa aca gtg gta aga aag aag ctt cag ttg gtg ggg ttg gtt gct atg ctg
 L   S   Q   Q   T   V   V   R   K   K   L   Q   L   V   G   L   V   A   M   L
tta gca tgc aag tat gaa gag gta tct gtt cca gtg gta gga gat ttg att ctc ata tca
 L   A   C   K   Y   E   E   V   S   V   P   V   V   G   D   L   I   L   I   S
gac aag gcc tac aac agg gaa gaa gtg ctt gaa atg gaa aag ttg atg ctc aat aaa tta
 D   K   A   Y   N   R   E   E   V   L   E   M   E   K   L   M   L   N   K   L
cag ttt aac atg tca ttt cca aca cca tat gtt ttc atg caa agg ttc ctc aag gct gct
 Q   F   N   M   S   F   P   T   P   Y   V   F   M   Q   R   F   L   K   A   A
cag tca gat aag aaa att gag atg ctg tcc ttc ttc atc att gag ctt tcc ctt gtg gag
 Q   S   D   K   K   I   E   M   L   S   F   F   I   I   E   L   S   L   V   E
tat gag atg ctc aag ttc cca cca tct tta tta gca gca gca gca ata tat act gct caa
 Y   E   M   L   K   F   P   P   S   L   L   A   A   A   A   I   Y   T   A   Q
tgc acc atc tat ggc ttt aag cag tgg aat agg acc tgt gaa tgg cac agt aac tat tca
 C   T   I   Y   G   F   K   Q   W   N   R   T   C   E   W   H   S   N   Y   S
gaa gat caa ctt ctc gaa tgt tca aga tta atg gtt ggt ttc cat cag aag gca ggg aca
 E   D   Q   L   L   E   C   S   R   L   M   V   G   F   H   Q   K   A   G   T
ggg aaa cta aca gga gta cac agg aaa tac aat aca tcc aag ttt gga cat act tca aaa
 G   K   L   T   G   V   H   R   K   Y   N   T   S   K   F   G   H   T   S   K
tgt gaa cca gca tgt ttt cta tta gag act cag tca tag
 C   E   P   A   C   F   L   L   E   T   Q   S   -
```

图 2 *RcMsc*2 基因 cDNA 序列及编码的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence and encoded amino acid sequence of *RcMsc*2 gene

2.2 RcMsc2 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 RcMsc2 蛋白的基本理化性质分析

Protparam 工具预测结果显示，RcMsc2 蛋白的分子式为 $C_{2186}H_{3426}N_{584}O_{662}S_{28}$，共计 6 886 个原子，相对分子质量为 49.38 kD，理论等电点为 5.26，说明 RcMsc2 蛋白呈酸性；该蛋白由 20 种氨基酸组成，其中谷氨酸（Glu）数量最庞大，占总数的 9 %，而色氨酸（Trp）数量最少，仅占总数的 0.7 %，带负电荷的氨基酸（Asp + Glu）有 60 个，带正电荷的氨基酸（Arg + Lys）有 46 个（图 2）；不稳定系数为 45.24（>40 阈值），表明该蛋白是不稳定蛋白；总平均疏水性为-0.353（<0），预测该蛋白是亲水蛋白；蛋白的脂肪指数为 81.69。另外，RcMsc2 蛋白拥有一个 Cyclin_C（pfam ID: PF02984）结构域和一个 Cyclin_N（pfam ID: PF00134），是 B 型细胞周期蛋白（cyclin）家族的一员（图 3）。

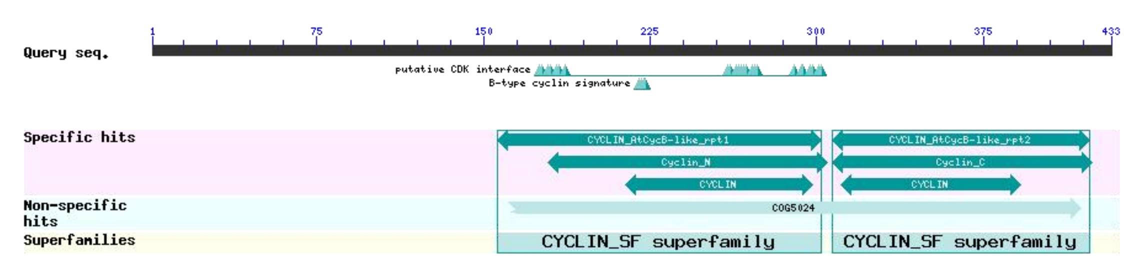
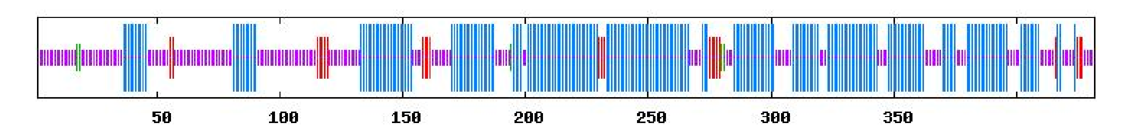


图 3 RcMsc2 蛋白的结构域预测结果

Fig. 3 Domain prediction results of RcMsc2 protein

2.2.2 RcMsc2 蛋白的高级结构预测

分析 RcMsc2 蛋白的二级、三级结构，可为蛋白功能研究提供基础支撑。RcMsc2 蛋白的二级结构预测结果显示（图 4），它是由 52.55%的α-螺旋、40.51%的无规则卷曲、5.79%的延伸链和 1.16%的β-转角共同构成的。从 RcMsc2 蛋白的三级结构预测图（图 5：A）中可以看出，RcMsc2 蛋白主要由α-螺旋构成。SAVES v6.0 模型检测工具结果显示（图 5：B），编码 RcMsc2 蛋白的 432 个氨基酸残基中有 91.1%位于 core 区域（红色区域 >90%，A、B 和 L 区），8.9%位于次允许区域（a、b、l 和 p），表明 SWISS-MODEL 预测的此蛋白三级结构模型是可靠的。

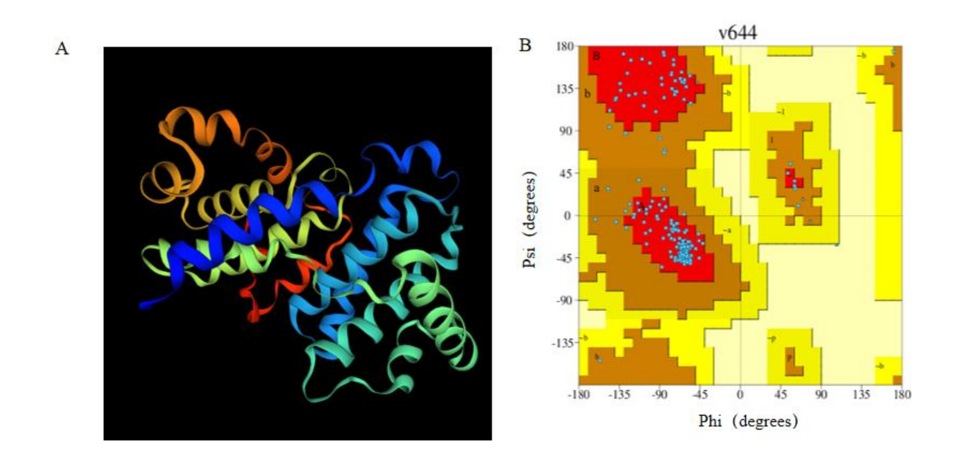


紫色表示无规则卷曲；绿色表示β-转角；蓝色表示α-螺旋；红色表示延伸链。

Purple indicates random coil; Green indicates β-turn; Blue indicates α-helix; Red indicates extended chain.

图 4 RcMsc2 蛋白质的二级结构预测

Fig. 4 Prediction on secondary structure of RcMsc2 protein



A. RcMsc2 蛋白质的三级结构预测；B. RcMsc2 蛋白质的三级结构的检测。

A. Prediction on tertiary structure of RcMsc2 protein; B. Detection on tertiary structure of RcMsc2 protein.

图 5 RcMsc2 蛋白质的三级结构预测和检测

Fig. 5 Prediction and detection on tertiary structure of RcMsc2 protein

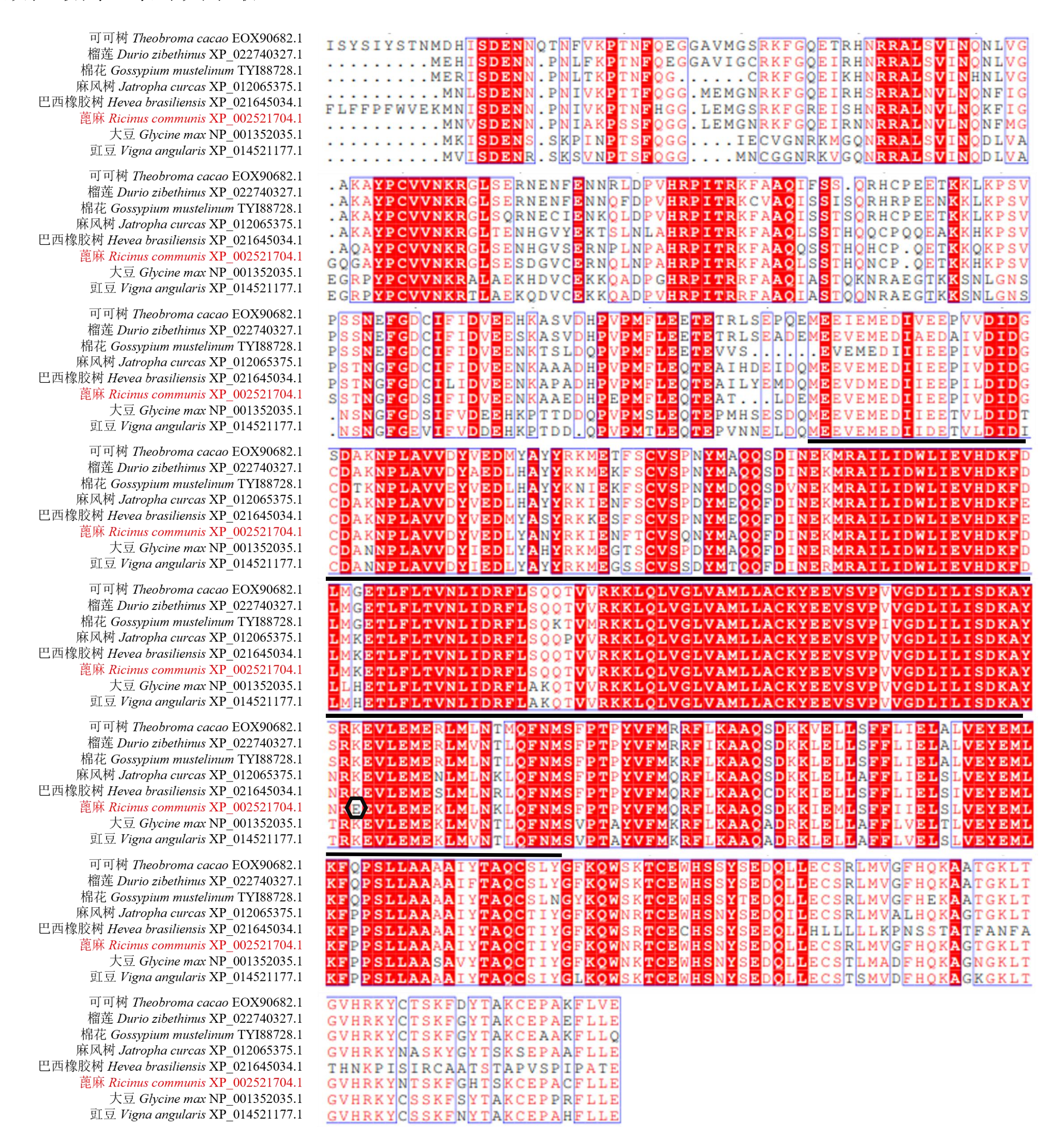
2.2.3 RcMsc2 蛋白的信号肽、跨膜域及生物活性位点预测

SignalP 5.0 预测 RcMsc2 蛋白中存在信号肽的可能性是 0.001 2，推测该蛋白中无信号肽结构。DeepTMHMM 预测结果显示，RcMsc2 蛋白的 432 个氨基酸残基上均无从外到内的跨膜域，所以推测 RcMsc2 蛋白不具备跨膜能力。Motif Scan 预测显示在 RcMsc2 蛋白内部有 6 个潜在的 N-糖基化位点（分别位于第 2 位～第 5 位、第 189 位～第 192 位、第 303 位～第 306 位、第 370 位～第 373 位、第 378 位～第 381 位和第 411 位～第 414 位氨基酸），4 个潜在的酪氨酸蛋白激酶 II 磷酸化位点（分别位于第 63 位～第 66 位、第 142 位～第 145 位、第 337 位～第 340 位和第 419 位～第 422 位氨基酸），3 个潜在的肉豆蔻基 N-肉豆蔻酰化位点（分别位于第 20 位～第 25 位、第 48 位～第 53 位和第 61 位～第 66 位氨基酸）和 7 个潜在的蛋白激酶 C 磷酸化位点（分别位于第 82 位～第 84 位、第 100 位～第 102 位、第 280 位～第 282 位、第 322 位～第 324 位、第 400 位～第 402 位、第 412 位～第 414 位和第 418 位～第 420 位氨基酸），共 20 个生物活性位点。这些位点的预测为解释 RcMsc2 蛋白在逆境中功能提供理论基础。

2.2.4 RcMsc2 蛋白的多序列对比及同源性分析

线上 Blast 比对发现，麻风树（*Jatropha curcas*，XP_012065375.1）、巴西橡胶树（*Hevea brasiliensis*，XP_021645034.1）、柳树（*Salix suchowensis*，XP_024456907.1）、可可树（*Theobroma cacao*，EOX90682.1）、榴莲（*Durio zibethinus*，XP_022740327.1）、棉花（*Gossypium mustelinum*，TYI88728.1）、大豆（*Glycine max*，NP_001352035.1）和豇豆（*Vigna angularis*，XP_014521177.1）与该蛋白的序列一致性依次是 87.4%、85.5%、81.1%、79.7%、79.7%、77.5%、72.7%和 72.7%，表明细胞周期蛋白在物种间高度保守，特别是 N 端蛋白的一致性较高，说明不同物种间的蛋白功能可能相似。另外，位于结构域内部的第 283 位氨基酸是细胞周期蛋白底物特异性位点，RcMsc2 蛋白是 E（谷氨酸），而其他植物是 K（赖氨酸），这可能导致蓖麻 RcMsc2 蛋白与其他植物的 CYCB2 蛋白拥有不同的底物特异性。MEGA 11.0 中邻接法构建的进化树结果显示（图 7），8 种植物的细胞周期蛋白共被聚为三类。同处于 Group I大豆和豇豆的蛋白在进化中钝化，步长值是 100%；Group II中蓖麻与麻风树和巴西橡胶树的步长值是 99.9%，与多序列比对结果相同；Group III中棉花与榴莲和可可树的步长值是 100%。Group I、Group II和 Group III分别对应豆科、大戟科和锦葵科植物，足以说明此进化树构建结果准确，揭示 CYCB2 蛋白在物种间的进化高度保守。因此，RcMsc2 蛋白与麻风树和巴西橡胶树的序列

一致性最高，亲缘关系最近。

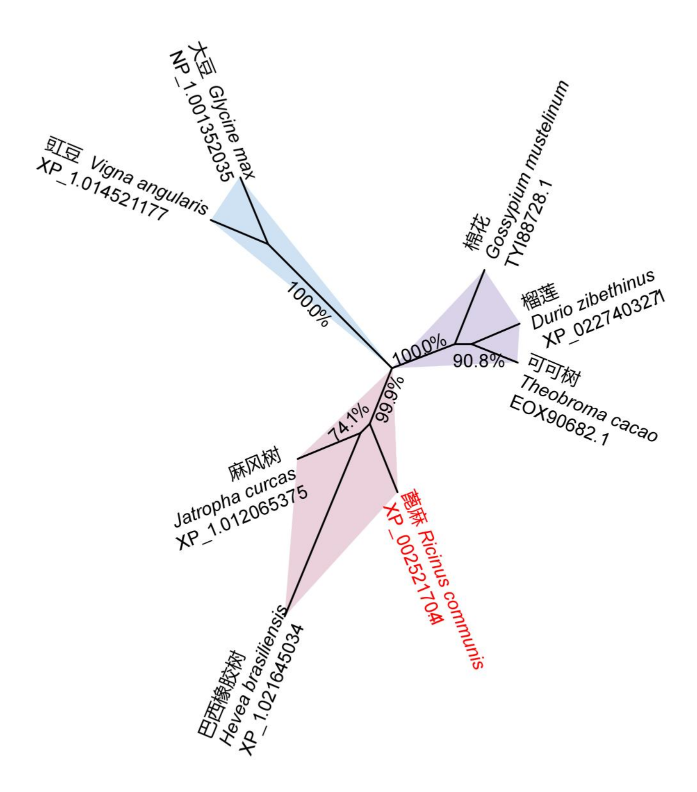


红色背景表示相似性 100%，蓝色框表示相似性 ＞90%；标记处位于第 283 位 aa；横线上侧表示 cyclin 结构域（156～301 aa）。

Red background indicates 100% similarity, blue frame indicates similarity> 90% ; the marker was located at 283 aa; The upper side of the horizontal line indicates the cyclin domain (156 – 301 aa).

图 6 RcMsc2 氨基酸序列及其他植物同源序列间多重比较

Fig. 6 Multiple homology comparisons of RcMsc2 amino acid sequence with other plants



蓝色表示 Group I；粉色表示 Group II；紫色表示 Group III。

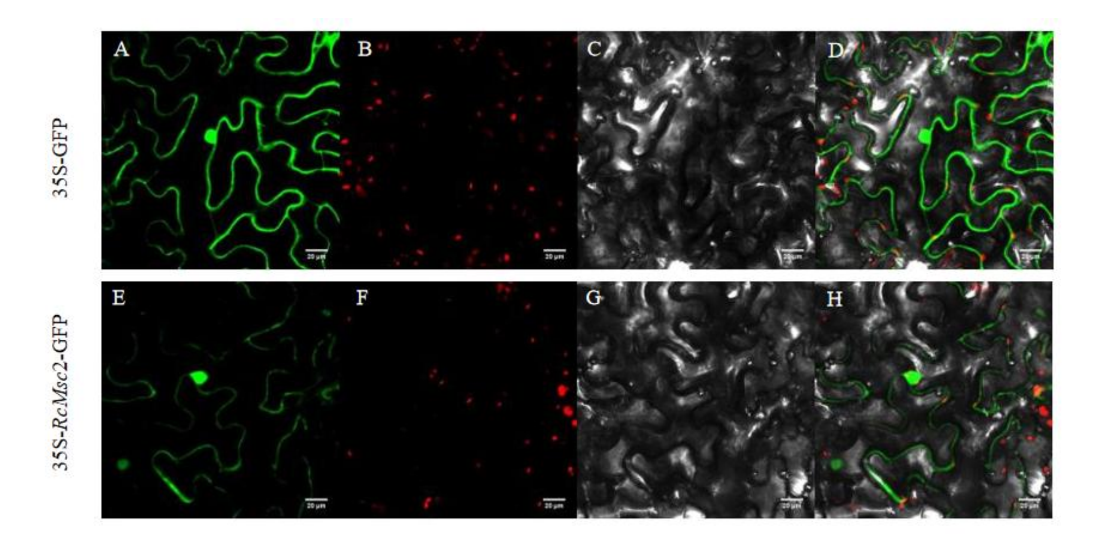
Blue indicates Group I; Pink indicates Group II; Purple indicates Group III.

图 7 不同植物的 CYCB2 蛋白的聚类分析

Fig. 7 Clustering analysis of CYCB2 proteins from different plants

2.3 RcMsc2 蛋白的亚细胞定位分析

PSORT 预测 RcMsc2 蛋白的亚细胞定位在细胞核的可能性最大。因此，为了验证 RcMsc2 蛋白亚细胞的具体位置，成功构建了由农杆菌（GV3103）介导的 pCAMBIA2300-CaMV 35S-*RcMsc*2-GFP 表达载体，并在烟草表皮细胞中瞬时表达。结果显示（图 8），35S-GFP 的绿色荧光蛋白在细胞核、细胞质和细胞膜中均有分布（图 8：A～D），而 35S-*RcMsc*2-GFP 中荧光蛋白则主要分布在细胞核和细胞膜（图 8：E），将结果合并后，叠加场中的 35S-*RcMsc*2-GFP 主要在烟草叶片的细胞核和细胞膜处有绿色荧光，但 *RcMsc*2 定位在细胞核的可能性较大，与 PSORT 预测结果一致，可为后续证明 RcMsc2 蛋白的抗逆功能提供依据。



A，E. 绿色荧光场；**B，F**. 叶绿体荧光通道；**C，G**. 明场；**D，H**. 叠加场；35S-GFP 为空载体，35S-*RcMsc*2-GFP 为包含 *RcMsc*2 的融合蛋白载体。

A, E. Green fluorescence field; **B, F**. Chloroplast fluorescence channel; **C, G**. Bright field; **D, H**. Merged field; 35S-GFP indicates the empty vector, and 35S-*RcMsc*2-GFP indicates the fusion protein vector with *RcMsc*2.

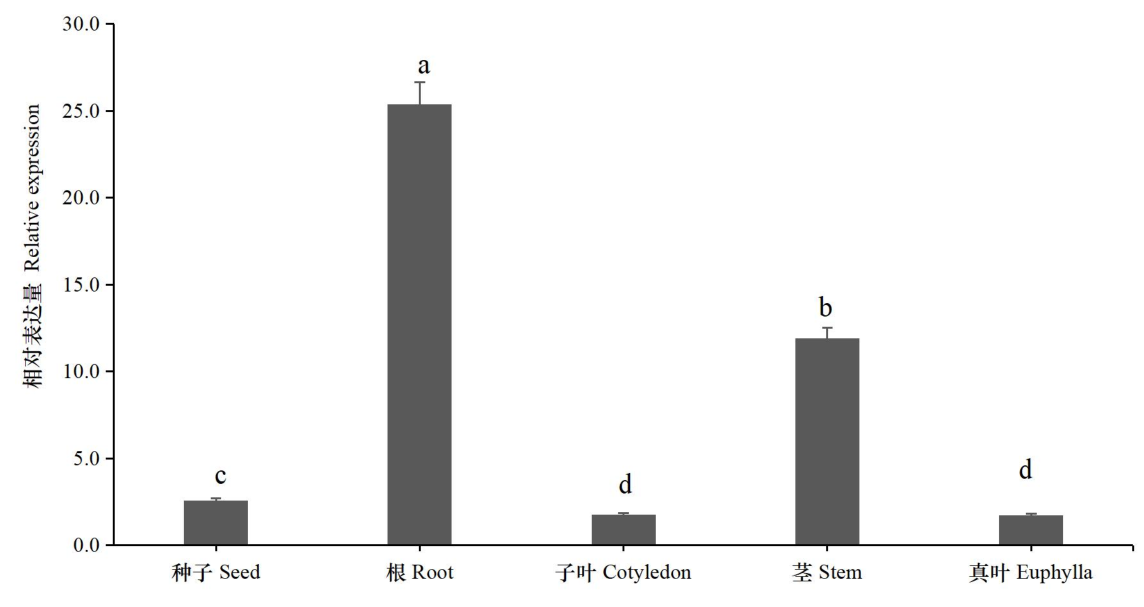
图 8 RcMsc2 蛋白在本氏烟草叶片中的亚细胞定位

Fig. 8 Subcellular localization of RcMsc2 protein in leaf epidermal cells of *Nicotiana benthamiana*

2.4 *RcMsc*2 基因的表达特征分析

2.4.1 *RcMsc*2 基因的组织表达模式分析

借助 qRT-PCR 技术分析 *RcMsc*2 基因在蓖麻不同组织中的表达水平（图 9）。结果发现，*RcMsc*2 基因在种子和幼苗期均有表达，呈显著差异（*P*<0.05）。其中，*RcMsc*2 基因在根中的表达量显著高于其他组织，表达量分别是子叶、茎和真叶的 2.13 倍、14.11 倍和 14.94 倍。这表明 *RcMsc*2 基因拥有明显的组织表达特异性，并且有可能在根和茎中表达以抵御不利环境。



柱子上方的不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05）。下同。

Different lowercase letters on the bar indicates significant differences（*P*<0.05）. The same below.

图 9 *RcMsc*2 基因的组织表达分析

Fig. 9 Tissue expression analysis of *RcMsc*2 gene

2.4.2 *RcMsc*2 基因的非生物胁迫表达模式分析

采用 qRT-PCR 方法，研究蓖麻幼苗叶片的 *RcMsc*2 基因在低温（4 ℃）、高盐（150 mmol·L^{-1} NaCl）、脱落酸（100 μmol·L^{-1} ABA）和干旱（10% PEG 6000）胁迫下的表达特征。结果显示，*RcMsc*2 基因在不同胁迫下随着时间梯度而差异表达（图 10），呈现出不同的表达模式。*RcMsc*2 基因积极应答盐胁迫和干旱胁迫，分别在 2 h 和 4 h 开始表达，且均在 4 h 出现峰值，表达量分别是对照组（0 h）的 3.09 倍和 4.82 倍（图 10：B，D）；*RcMsc*2 基因在低温和 ABA 处理下呈延迟表达模式，均在 12 h 出现最大值，但 ABA 胁迫 12 h 后 *RcMsc*2 的表达量骤降，表明 *RcMsc*2 基因在低温条件下的表达可能受 ABA 激活，并持续表达至 48 h，说明 *RcMsc*2 可能是一个冷诱导基因，且延迟 12 h 后才被激活表达。

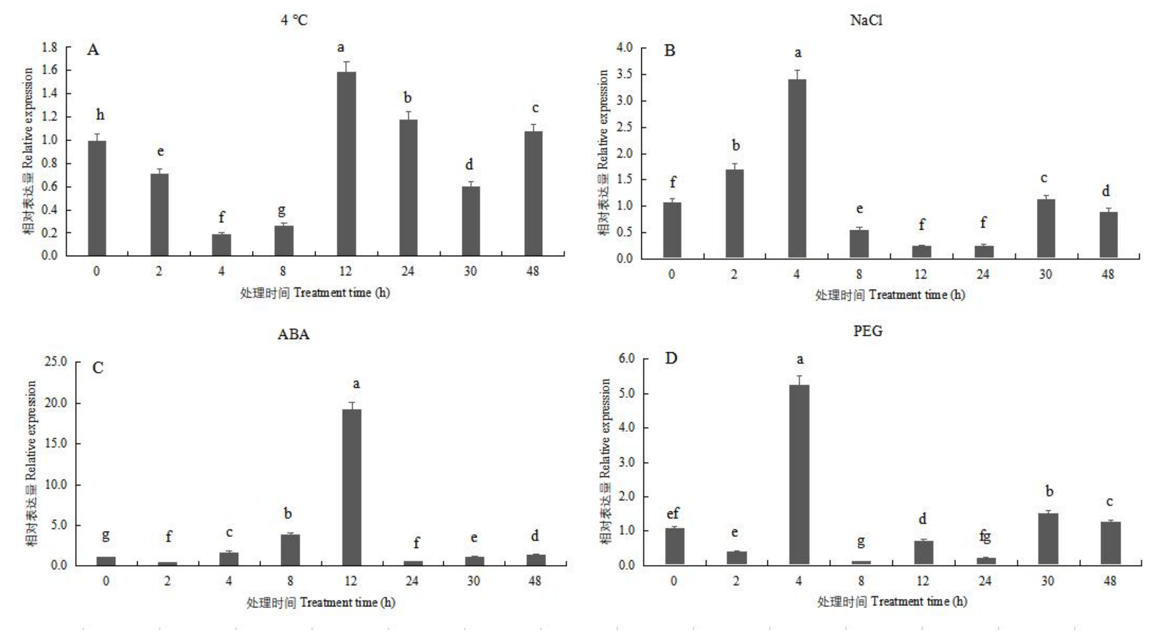


图 10 *RcMsc*2 基因在不同胁迫下的表达模式

Fig. 10 Expression patterns of *RcMsc*2 gene under different stresses

3 讨论与结论

细胞周期蛋白与 CDKs 复合以控制 CDKs 的活性、底物和亚细胞位置，在植物细胞周期的细胞分裂过程中发挥着极其重要的作用（Loyer & Trembley., 2020），而 CYCB2 蛋白主要在 G2 期发挥作用（Aydinoglu, 2020）。*CYCB*2 基因隶属于多基因家族，在大豆（Fonseca-García et al., 2021）、苜蓿（Meng et al., 2020）和拟南芥（Sterken et al., 2012）的基因组中分别有 13、12 和 11 个 *CYCB*2 基因，并且他们都含有相同的结构域，即 Cyclin_C 和 Cyclin_N，并有相关功能方面的研究，而关于蓖麻的 Msc2 蛋白功能研究较少。因此，本研究根据蓖麻低温转录组数据克隆出 *RcMsc*2 基因，研究发现其推导 432 个氨基酸，蛋白长度短于拟南芥 CYCB2;3（Van et al., 2010），但明显长于苜蓿的 MedtrCycB1;2、MedtrCycB2;1 和 MedtrCycB2;2 蛋白（Meng et al., 2020）。RcMsc2 蛋白的理化性质与大豆（Fonseca-García et al., 2021）、苜蓿（Meng et al., 2020）、番茄（Anwar et al., 2019）和高粱（Roy et al., 2016）等的细胞周期蛋白存有一定差异，这可能是导致不同物种的细胞周期蛋白参与不同逆境的直接原因。RcMsc2 蛋白的序列特征分析表明，该蛋白主要由α-螺旋组成，且是一个亲水蛋白，无信号肽结构，这与前人研究结果一致（Lara-Núñez et al., 2015; Sui et al., 2016）。

研究发现，高等植物的蛋白肉豆蔻酰化修饰可以帮助其应对多种不利环境（Shitani et al.,

2000; Podell & Gribskov, 2004）。然而受环境诱导表达的蛋白不是单独起作用的，而是多个蛋白共同协作从而提高植株在逆境中的活力（豆玉娟等，2014）。RcMsc2 蛋白存在三个 N-肉豆蔻酰化作用位点，极有可能在低温下诱导与低温相关的蛋白来共同合作来抵御低温环境，进而提高蓖麻植株在低温环境下的存活能力。研究显示，CYCB2 蛋白在细胞核（Sabelli et al., 2014）、纺锤体（Bulankova et al., 2013）、内质网（Boruc et al., 2010）、细胞质和细胞膜（Boruc et al., 2010）中均有分布，而 CYCB2 型蛋白则主要定位在细胞核（Lara-Núñez et al., 2021; Chun et al., 2021），并会根据环境的不同来调整位置以适应逆境（Boruc et al., 2010），RcMsc2 蛋白的亚细胞定位结果表明，该蛋白明显定位在细胞核，并且作为一个核蛋白，极可能在冷胁迫过程中发挥着重要作用。

研究显示，植物的 *CYCB*2 基因家族成员在应对多逆境胁迫时可以激发各种防御机制来提高植株的存活率（Huang et al., 2020; Zhang et al., 2021）。同时该家族成员还拥有明显的胁迫表达时空特异性，高粱的 *CYCB2* 基因的表达与 Cd 浓度呈显著正相关，即在 100 μmol·L^{-1} Cd 处理下的表达量显著低于 150 μmol·L^{-1}（Roy et al., 2016）；甘蓝的 4 个 *CYCB*2 基因（*CYCB*2;1～*CYCB*2;4）在冷处理 2～7 d 基因表达量相似，均在第 2 d 表达出现峰值（Ćosić et al., 2019）。*RcMsc2* 基因在 ABA、PEG、4 ℃和 NaCl 胁迫下的叶片中均表达，而该基因在高盐和干旱胁迫下的表达模式相仿，均在处理的前 4 h 就已经表达并出现峰值，*RcMsc*2 基因在脱落酸和低温处理下呈延迟表达模式，其中该基因在低温环境下持续表达至 48 h，表明该基因是一个冷调控基因，并且极有可能受到 ABA 激活，说明该基因响应多环境压力的诱导，但其对低温的响应时间更持久。另外，细胞周期蛋白家族基因成员还有明显的组织表达特异性，拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）突变株（*gig*1 和 *uvi*4）内的 *cycb*2;2 和 *CYCB*1;1 在子叶和下胚轴中拥有明显的组织表达特异性，并且可能在地塞米松（dexamethasone）的诱导下在下胚轴中起作用（Iwata et al., 2012）。本研究表明，蓖麻 *RcMsc*2 基因在种子期与幼苗期均表达，并且拥有明显的组织表达特异性，该基因极大可能在低温环境下在蓖麻的茎和叶中发挥作用，而在不同组织中调控机制还需深入探索。因此，本研究为蓖麻 *RcMsc*2 基因在应答冷胁迫方面的分子机制提供了参考。

参考文献：

AYDINOGLU F, 2020. Elucidating the regulatory roles of microRNAs in maize (*Zea mays* L.) leaf growth response to chilling stress [J]. Planta, 251(2): 1-15.

BAI X, CAO S, XIANG DJ, et al., 2019. Transcriptome analysis of castor seeds at germination stage under low temperature [J]. Mol Plant Breed, 17(12): 3834-3844. [白雪，曹帅，向殿军，等，2019. 低温条件下蓖麻种子萌发期转录组分析[J]. 分子植物育种，17(12): 3834-3844.]

BORUC J, MYLLE E, DUDAM, et al., 2010. Systematic localization of the *Arabidopsis* core cell cycle proteins reveals novel cell division complexes [J]. Plant Physiol, 152(2): 553-565.

BORUC J, VAN DEN DAELE H, HOLLUNDER J, et al., 2010. Functional modules in the *Arabidopsis* core cell cycle binary protein–protein interaction network [J]. Plant Cell, 22(4): 1264-1280.

BULANKOVA P, AKIMCHEVA S, FELLNER N, et al., 2013. Identification of *Arabidopsis* meiotic cyclins reveals functional diversification among plant cyclin genes [J]. PLoS Genet, 9(5): e1003508.

CANAUD G, BROOKS CR, KISHI S, et al., 2019. Cyclin G1 and TASCC regulate kidney epithelial cell G2-M arrest and fibrotic maladaptive repair [J]. Sci Transl Med, 11(476): eaav4754.

CHUN JI, KIM SM, KIM H, et al., 2021. *SlHair*2 regulates the initiation and elongation of type I

trichomes on tomato leaves and stems [J]. Plant Cell Physiol, 62(9): 1446-1459.
ĆOSIĆ T, RASPOR M, SAVIĆ J, et al., 2019. Expression profiles of organogenesis-related genes over the time course of one-step de novo shoot organogenesis from intact seedlings of kohlrabi [J]. J Plant Physiol, 232: 257-269.
DOU YJ, CAO F, MA Y, et al., 2014. Cloning of *bHLH*78 gene expressed specifically in fruits of cultivated strawberry and construction of overexpression vector [J]. Mol Plant Breed, 12(3): 456-465. [豆玉娟，曹飞，马跃，等，2014. 栽培草莓果实中特异表达的 *bHLH*78 基因的克隆及过量表达载体构建[J]. 分子植物育种，12(3): 456-465]
FAN W, XIA ZQ, LIU CY, et al., 2022. Ionomics, transcriptomics and untargeted metabolomics analyses provide new insights into the Cd response and accumulation mechanisms of mulberry [J]. Environ Exp Bot, 196: 104821.
FONSECA-GARCÍA C, NAVA N, LARA M, et al., 2021. An *NADPH* oxidase regulates carbon metabolism and the cell cycle during root nodule symbiosis in common bean (*Phaseolus vulgaris*) [J]. BMC Plant Biol, 21(1): 1-16.
HÉGARAT N, CRNCEC A, SUAREZ PEREDO RODRIGUEZ MF, et al. 2020. Cyclin A triggers Mitosis either via the Greatwall kinase pathway or Cyclin B [J]. EMBO J, 39(11): e104419.
HU X, CHENG X, JIANG H, et al., 2010. Genome-wide analysis of cyclins in maize (*Zea mays*) [J]. Genet Mol Res, 9(3): 1490-1503.
HUANG CZ, LEI X U, SUN JJ, et al., 2020. Allelochemical p-hydroxybenzoic acid inhibits root growth via regulating ROS accumulation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. J Integ Agric, 19(2): 518-527.
HUANG Y, SRAMKOSKI RM, JACOBBERGER JW, et al., 2013. The kinetics of G2 and M transitions regulated by B cyclins [J]. PLoS ONE, 8(12): e80861.
IWATA E, IKEDA S, ABE N, et al., 2012. Roles of *GIG*1 and *UVI*4 in genome duplication in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Signal Behav, 7(9): 1079-1081.
KÕIVOMÄGI M, VALK E, VENTA R, et al., 2011. Dynamics of Cdk1 substrate specificity during the cell cycle [J]. Mol Cell, 42(5): 610-623.
LARA-NÚÑEZ A, ROMERO-SÁNCHEZ DI, AXOSCO-MARÍN J, et al., 2021. Two cyclin Bs are differentially modulated by glucose and sucrose during maize germination [J]. Biochimie, 182: 108-119.
LARA-NÚÑEZ A, VENTURA-GALLEGOS JL, ANAYA A L, et al., 2015. Phytotoxicity of Sicyos deppei during tomato germination and its effects on the role of ABA and cell wall enzymes [J]. Bot Sci, 93(4): 771-781.
LOYER P, TREMBLEY JH, 2020. Roles of *CDK/Cyclin* complexes in transcription and pre-mRNA splicing: Cyclins L and *CDK*11 at the cross-roads of cell cycle and regulation of gene expression [J]. Seminars Cell Dev Biol, 107: 36-45.
MAGHULY F, VOLLMANN J, LAIMER M, 2015. Biotechnology of euphorbiaceae (*Jatropha curcas*, *Manihot esculenta*, *Ricinus communis*) [J]. Appl Plant Genom Biotechnol: 87-114.
MENG J, PENG MD, YANG J, et al., 2020. Genome-wide analysis of the cyclin gene family and their expression profile in *medicago truncatula* [J]. Int J Mol Sci, 21(24): 9430.
PODELL S, GRIBSKOV M, 2004. Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins [J]. BMC Genom, 5(1):37.
ROY SK, CHO SW, KWON SJ, et al., 2016. Morpho-physiological and proteome level responses to cadmium stress in sorghum [J]. PLoS ONE, 11(2): e0150431.

SABELLI PA, DANTE RA, NGUYEN HN, et al., 2014. Expression, regulation and activity of a B2-type cyclin in mitotic and endoreduplicating maize endosperm [J]. Front Plant Sci, 5: 561.

SEVERINO LS, AULD DL, BALDANZI M, et al., 2012. A review on the challenges for increased production of castor [J]. Agron J, 104(4): 853-880.

SHITANI M, LIU JP, HALFTER U, et al., 2000. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding [J]. Plant Cell, 12(9):1667-78.

STERKEN R, KIEKENS R, BORUC J, et al., 2012. Combined linkage and association mapping reveals *CYCD*5; 1 as a quantitative trait gene for endoreduplication in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci, 109(12): 4678-4683.

SUI ZP, WANG TY, LI HJ, et al., 2016. Overexpression of peptide-encoding *OsCEP6.1* results in pleiotropic effects on growth in rice (*O. sativa*) [J]. Front Plant Sci, 7: 228.

SURYADINATA R, SADOWSKI M, SARCEVIC B, 2010. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates [J]. Biosci Rep, 30(4): 243-255.

TAO ZX, HUANG WJ, WANG HJ, 2020. Soil moisture outweighs temperature for triggering the green-up date in temperate grasslands [J]. Theor Appl Climatol, 140(3): 1093-1105.

TRABELSI ABH, ZAAFOURI K, BAGHDADI W, et al., 2018. Second generation biofuels production from waste cooking oil via pyrolysis process [J]. Renewable Energy, 126: 888-896.

VAN LEENE J, HOLLUNDER J, EECKHOUT D, et al., 2010. Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol Syst Biol, 6(1): 397.

WANG XY, WU Y, SUN MD, et al., 2022. Dynamic transcriptome profiling revealed key genes and pathways associated with cold stress in castor (*Ricinus communis* L.) [J]. Ind Crops Products, 178: 114610.

XU J, GAO GL, DU JJ, et al., 2010. Cell cycle modulation in response of the primary root of arabidopsis to ABA [J]. Pak J Bot, 42(4): 2703-2710.

YAN XX, GUAN YY, LIU XY, et al., 2021. *NtCycB2* gene knockout enhances resistance to high salinity stress in Nicotiana tabacum [J]. Ind Crops Products, 171: 113886.

ZHANG H, LU XY, WANG ZJ, et al., 2021. Excretion from long glandular trichomes contributes to alleviation of cadmium toxicity in *Nicotiana tabacum* [J]. Environ Pollut, 285: 117184.